



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Medicina e Chirurgia

**POR Campania FSE 2014-2020 – Asse III - Obiettivo Specifico 17 - Azione 10.5.6  
"Progetto Dottorati di Ricerca – CUP D49G14000360006"  
Avviso pubblico approvato con D.D. n. 25 del 18.02.2014**

Corso di Dottorato in  
“Medicina traslazionale dello sviluppo dell’invecchiamento attivo”  
(Ciclo XXX)

**Nuova caratterizzazione immunofenotipica del melanoma  
sottile.  
Correlazione con i parametri anatomico-patologici e con  
la prognosi di malattia.**

Tutor: Prof. Stefano Pepe

Co-tutor: Prof. Corrado Rubino

Coordinatore: Prof. Gaetano Guerra

Candidato: Dott. Celeste Fusciello





# Università degli Studi Salerno

Dipartimento di Medicina e Chirurgia

Corso di Dottorato in Medicina traslazionale dello  
sviluppo dell'invecchiamento attivo

CICLO XXX

**CURRICULUM: Tecnologie innovative in medicina traslazionale**

Tesi di Dottorato

**Nuova caratterizzazione immunofenotipica del  
melanoma sottile.**

**Correlazione con i parametri anatomo-patologici e con  
la prognosi di malattia.**

Il Tutor:  
Chiar.mo Prof. Stefano Pepe

Candidato:  
Celeste Fusciello

Il Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Corrado Rubino

Anno Accademico 2016-2017

## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. SOMMARIO.....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>2.INTRODUZIONE.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2.1 IL MELANOMA: INQUADRAMENTO ANATOMO-PATOLOGICO.....</b>  | <b>6</b>  |
| 2.1.1 Dati epidemiologici  |           |
| 2.1.2 Eziologia e fattori di rischio   |           |
| <b>2.2 DIAGNOSI PATOLOGICA ED INDICATORI PROGNOSTICI.....</b>  | <b>9</b>  |
| 2.2.1 Sottotipi istologici   |           |
| 2.2.2 Fase di crescita ed indice mitotico  |           |
| 2.2.3 Spessore di <i>Breslow</i>   |           |
| 2.2.4 Livello di <i>Clark</i>  |           |
| 2.2.5 Ulcerazione  |           |
| <b>2.3 STADIAZIONE PATOLOGICA E CLASSIFICAZIONE MOLECOLARE...13</b>  |           |
| 2.3.1 Stadiazione patologica   |           |
| 2.3.2 Alterazioni molecolari   |           |
| <b>2.4 IL MICROAMBIENTE TUMORALE NEL MELANOMA:<br/>RUOLO DELLE CELLULE DEL SISTEMA IMMUNITARIO ED<br/>IMMUNOTERAPIE.....</b> | <b>16</b> |
| 2.4.1 Microambiente ed <i>Immunoscore</i> nel melanoma   |           |
| 2.4.2 CD8  |           |
| 2.4.3 GRZ-B  |           |
| 2.4.4 FOXP3  |           |
| 2.4.5 HLA  |           |
| 2.4.6 PD-1/ PD-L1 e “ <i>tumorescape</i> ”   |           |
| <b>2.5 IMMUNOTERAPIE .....</b>   | <b>22</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4. SCOPO DELLA TESI .....</b>  | <b>26</b> |
| <b>5. MATERIALI E METODI .....</b>  | <b>27</b> |
| 5.1 Follow up dei pazienti  |           |
| 5.2 Procedura immunohistochimica per CD3, CD8, CD138, FOXP3, GRZ-B,PD-L1, HLA   |           |
| 5.2.1 Deparaffinatura, reidratazione e smascheramento   |           |
| 5.2.2 Blocco delle perossidasi endogene   |           |
| 5.2.3 Blocco proteico   |           |
| 5.2.4 Incubazione con anticorpo primario  |           |
| 5.2.5 Reazione di visualizzazione   |           |
| 5.2.6 Sviluppo cromogenico  |           |
| 5.2.7 Controcolorazione   |           |
| 5.2.8 Disidratazione, Chiarificazione, Montaggio e Lettura al microscopio   |           |
| <b>5.3 DOPPIA IMMUNOISTOCHIMICA .....</b>   | <b>30</b> |
| <b>5.4 VALUTAZIONE IHC.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>5.5 ANALISI STATISTICA .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>6. RISULTATI.....</b>  | <b>33</b> |
| <b>6.1 CARATTERISTICHE CLINICHE DEI PAZIENTI SELEZIONATI .....</b>  | <b>33</b> |
| <b>6.2 ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHIMICA DEI MARCATORI DELL'INFILTRATO LINFOCITARIO .....</b>                                   | <b>34</b> |
| <b>5.3 DESCRIZIONE DELLA CARATTERIZZAZIONE DELL'INFILTRATO LINFOCITARIO IN RELAZIONE ALLE CARATTERISTICHE CLINICHE.....</b> | <b>35</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5.4 RELAZIONE TRA LA CARATTERIZZAZIONE DELL'INFILTRATO<br/>LINFOCITARIO E LE CARATTERISTICHE CLINICHE.....</b> | <b>36</b> |
| <b>6. DISCUSSIONE.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>7. REFERENZE.....</b>  | <b>42</b> |

## 1. SOMMARIO

Il melanoma è una neoplasia maligna che origina dai melanociti presenti nello strato basale dell'epidermide, nei bulbi piliferi, nelle mucose, nell'occhio, nell'orecchio interno e nelle meningi.

La neoplasia cutanea è in progressivo aumento in tutto il mondo e a partire dall'anno 2004 la sua incidenza nella popolazione caucasica è aumentata del 3% ogni anno (1,2). Si stima che il melanoma sia la quinta neoplasia più frequente nei maschi e la sesta nel sesso femminile (3). In Italia si registrano in media circa 13-14 casi di melanoma ogni 100.000 abitanti. (4)

Se consideriamo i dati di sopravvivenza, essa risulta pari al 90% circa per i melanomi "sottili", mentre scende al 50% nel caso di coinvolgimento linfonodale loco-regionale, fino ad arrivare al 10% nel caso di disseminazione metastatica (stadio IV) (2,5). Al progressivo aumento di incidenza della neoplasia non corrisponde un aumento della mortalità che, negli ultimi anni, sembra essere stabile (3). Questo evento in parte potrebbe essere legato alle campagne di sensibilizzazione e di screening della popolazione, come dimostrato da alcuni studi (6), e alla maggiore conoscenza e accuratezza delle metodiche diagnostiche cliniche e di dermatoscopia.

Il microambiente tumorale è una componente essenziale per il processo neoplastico, in quanto favorisce la proliferazione delle cellule tumorali, la sopravvivenza e la migrazione.

Il trattamento terapeutico del melanoma avanzato è stato completamente rivoluzionato dall'introduzione dei farmaci che bersagliano le molecole dei check-point immunitari, come CTLA-4, PD-L1 e PD-1.

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo principale quello di valutare l'espressione immunoistochimica (IHC) di alcuni marcatori dell'infiltrato linfocitario, CD8, FOXP3, GRZB, HLA e PD-L1, presenti nel microambiente tumorale. Sono stati selezionati 31 casi relativi a pazienti con diagnosi di melanoma sottile, ovvero di spessore inferiore o uguale ad 1mm. In questo studio abbiamo voluto caratterizzare l'immunofenotipo della componente infiammatoria del microambiente tumorale in una

casistica di melanomi sottili per verificare se e quali componenti cellulari possano essere associati all'andamento clinico della patologia.

I nostri dati hanno evidenziato che l'infiltrato linfocitario, nelle sue componenti più rappresentative, può influenzare l'outcome clinico, e che la combinazione di più biomarcatori può rappresentare un importante strumento prognostico/predittivo per la stratificazione dei pazienti affetti da melanoma diagnosticato in fase precoce.

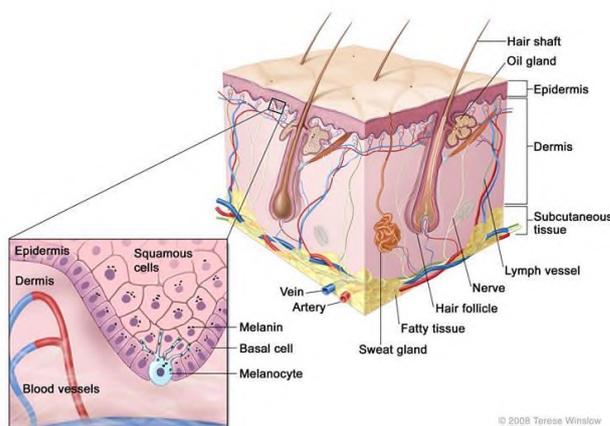
## 2. Introduzione

### 2.1 IL MELANOMA: inquadramento anatomo-patologico

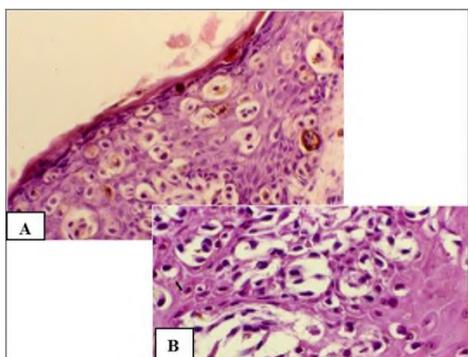
Il melanoma è un tumore cutaneo maligno che deriva dalla trasformazione neoplastica dei melanociti [fig.1]. Tali cellule, localizzate nell'epidermide, sono in grado di conferire la pigmentazione cutanea grazie alla biosintesi della melanina. Quest'ultima una volta formata, e accumulata all'interno di specifici organelli di deposito detti melanosomi, viene trasferita ad altre cellule cutanee, gli adiacenti cheratinociti. La produzione di melanina aumenta in risposta alle radiazioni ultraviolette e i melanosomi si accumulano intorno al nucleo delle cellule cutanee, proteggendo il loro DNA dall'azione dannosa e mutagena dei raggi ultravioletti. Pertanto, la melanina, svolge fisiologicamente importanti funzioni protettive. La cute è colpita nell'85% circa dei casi. Il melanoma cutaneo rappresenta il 3-5% dei tumori della pelle ed è tra questi il più

temibile per la sua elevata propensione a sviluppare metastasi (Boring et al, 1991).

Con l'eccezione delle più rare forme amelanotiche (melanoma acromico), il melanoma si presenta come una neoformazione pigmentata, più o meno estesa in superficie ed in profondità, con tendenza



all'ulcerazione tardiva e a metastatizzazione per via linfatica ed ematica; può insorgere su cute sana o su un nevo melanocitico acquisito o congenito preesistente; in rari casi l'esordio è di tipometastatico senza che sia evidente la lesione d'origine.



[fig.1] Melanoma cutaneo (A); particolare di A, crescita pagetoide dei melanociti (B).

### 2.1.1 Dati epidemiologici

Circa l'85% dei melanomi cutanei che insorgono annualmente nel mondo interessano le popolazioni di Nord-America, Europa e Oceania (1). L'incidenza è maggiore nella razza caucasica; si tratta di uno dei principali tumori che insorge in giovane età e attualmente in Italia costituisce il terzo tumore più frequente in entrambi i sessi al di sotto dei 49 anni ed oltre il 50% dei casi di melanoma viene diagnosticato entro i 59 anni (2). Nell'Unione Europea l'incidenza di melanoma è di 9 casi/100.000 per anno; tende ad aumentare con la latitudine con maggiore prevalenza nelle popolazioni con scarsa pigmentazione (12-17 casi/100.000 per anno) rispetto a quelle dei paesi mediterranei (3-5 casi/100.000 per anno). La mortalità è di 2,3 casi/100.000 per anno e rispetto all'incidenza risulta meno influenzata dalla latitudine (1).

### 2.1.2 Eziologia e fattori di rischio

I principali fattori di rischio per il melanoma includono: il numero di nevi comuni e atipici, le caratteristiche fenotipiche, la storia familiare o personale di melanoma e/o carcinomi e lesioni precancerose ed il pattern di esposizione alle radiazioni ultraviolette. (7,8)

- ❖ **FATTORI DI RISCHIO ESOGENI:** Radiazioni ultraviolette UVB e UVA; lampade artificiali abbronzanti; terapie immunosoppressive.
  
- ❖ **FATTORI DI RISCHIO ENDOGENI:** Colore della cute, dei capelli e degli occhi; nevi congeniti di grandi dimensioni; familiarità; mutazioni genetiche (geni CDKN2A, CDK4, BAP1); anamnesi positiva per tumori cutanei "Non Melanoma". (9)

La **Regola ABCDE** [fig. 2] descritta originariamente da Friedman et al. viene oggi incluso tra The Seven Warning Signals of Cancer del The American Cancer Society ed è un metodo semplice che consente di individuare un nevo a rischio.

Questo metodo prende in considerazione le caratteristiche macroscopiche di un nevo. Se due o più parametri sono individuabili, il nevo si può considerare a rischio. Si ritiene quindi che sia un metodo di facile applicazione che consente al medico di base o spesso allo stesso paziente di identificare nevi a rischio da sottoporre al giudizio dermatologico.



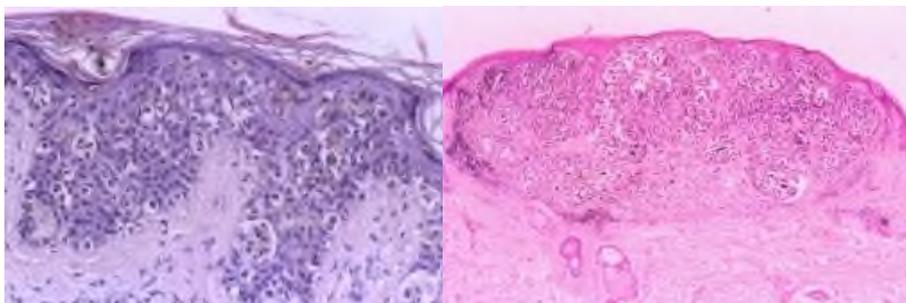
[Fig. 2] Rappresentazione del sistema ABCDE per la diagnosi macroscopica.

## 2.2 Diagnosi patologica ed indicatori prognostici

### 2.2.1 Sottotipi istologici

I melanomi vengono distinti in differenti sottogruppi a seconda di alcune caratteristiche cliniche ed istopatologiche(10). Per la classificazione istologica del melanoma si fa riferimento alla classificazione WHO 2006 che comprende i quattro tipi principali di melanoma: melanoma a diffusione superficiale, melanoma nodulare, lentigo maligna ed il melanoma acrale-lentiginoso. Esistono inoltre numerose varianti istopatologiche rare, tra le quali è opportuno ricordare il melanoma desmoplastico ed il melanoma nevoide.

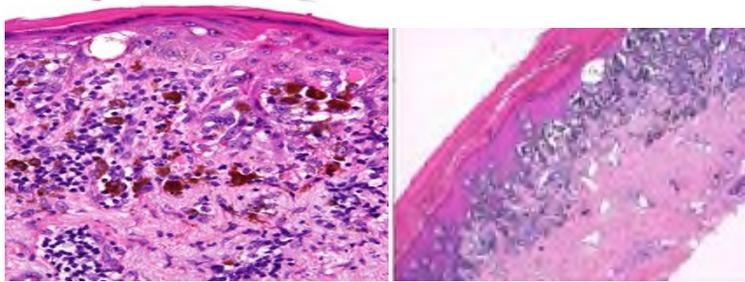
- **Melanoma a diffusione superficiale:** è il sottotipo di melanoma più frequente ed è caratterizzato generalmente da una lesione pigmentata, asimmetrica a margini irregolari (11)spesso con aree di pigmentazione differente [fig. 3]. Può essere notata dal paziente come area pigmentata che muta nella forma, dimensioni, spesso con zone di sanguinamento o formazione di croste alternate a regioni infiammatorie. Generalmente il cambiamento avviene con un lasso temporale da pochi mesi ad anni.



[fig.3] Melanoma a diffusione superficiale [fig. 4] Melanoma nodulare

- **Melanoma nodulare:** è il secondo sottotipo di melanoma [fig. 4] in ordine di frequenza ed è caratterizzato da una lesione pigmentata rilevata a rapida crescita (anche di poche settimane), spesso accompagnata da ulcerazione e sanguinamento (12).
- **Lentigo maligna melanoma:** questa lesione pigmentata a margini irregolari di aspetto piano, si accresce generalmente nelle aree fotoesposte del volto e del

collo ed ha una chiara relazione all'esposizione al sole (13). L'accrescimento è generalmente lento, con fase iniziale di melanoma in situ di lunga durata prima di progredire a melanoma invasivo [fig. 5]



[fig. 5] Lentigo maligna melanoma [fig. 6] Melanoma acrale-lentiginoso

- **Melanoma acrale-lentiginoso:** lesione pigmentata (14) piuttosto rara che si presenta a livello del palmo delle mani/pianta dei piedi o nel letto ungueale [fig. 6]. Il sottotipo istologico non è considerato ad oggi un fattore prognostico indipendente. (15)

### 2.2.2 Fase di crescita ed indice mitotico

La fase di crescita del melanoma, verticale rispetto a radiale, condiziona in maniera determinante la prognosi (16,17). Il referto istopatologico dovrebbe, pertanto, sempre contenere questa informazione eccetto che per il melanoma nodulare che presenta per definizione il pattern di crescita verticale. La fase radiale è la fase non tumorigenica, caratterizzata dalla proliferazione di melanociti nell'epidermide e/o nel derma papillare, senza formazione di nodulo tumorale. La fase di crescita verticale rappresenta la fase tumorigenica nella quale il melanoma acquisisce la capacità di metastatizzare ed è caratterizzata morfologicamente dalla presenza di un nodulo espansivo di dimensioni maggiori rispetto agli aggregati intraepidermici e/o dalla presenza di figure mitotiche nella componente invasiva.

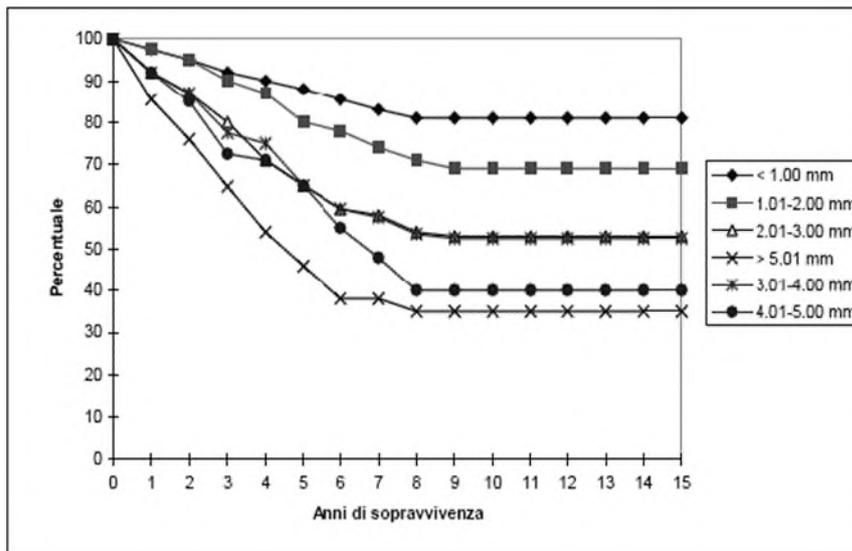
Il numero di mitosi/mm<sup>2</sup> costituisce un importante fattore prognostico ed è stato introdotto come variabile utile per la stadiazione nell'ultima revisione del sistema di classificazione AJCC (18).

L'indice mitotico appare essere un fattore prognostico anche per melanomi considerati apparentemente a basso rischio (< 0,76 mm di spessore). In questo senso, è sufficiente

che vi sia una mitosi/mm<sup>2</sup> per decidere se effettuare o meno la biopsia del linfonodo sentinella.

### 2.2.3 Spessore di Breslow

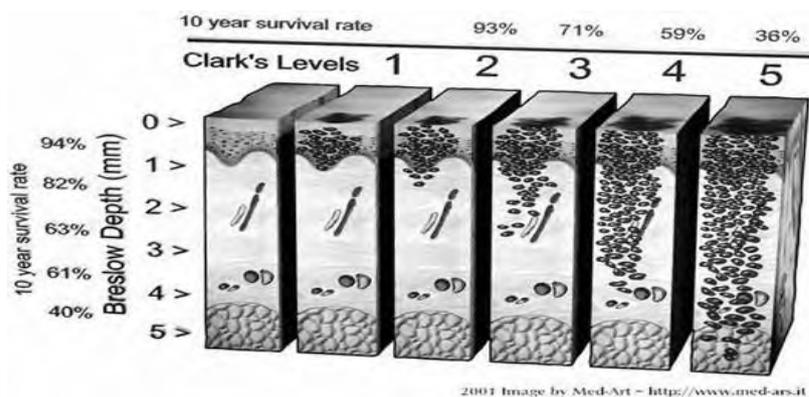
Una importante correlazione tra spessore di Breslow e prognosi della malattia è da sempre stata riconosciuta [fig.7] (17,19). Lo spessore di Breslow, pertanto è considerato il fattore prognostico più importante e dovrebbe sempre essere riportato nel referto istopatologico di ogni melanoma invasivo. Lo spessore secondo Breslow rappresenta il parametro prognostico, che viene misurato dallo strato granuloso o, se la lesione è ulcerata, dal fondo dell'ulcerazione, fino al punto di massima infiltrazione.



[fig. 7] Relazione tra sopravvivenza e livello di Breslow

## 2.2.4 Livello di Clark

Il livello di invasione secondo Clark ha dimostrato possedere un valore aggiunto da un punto di vista prognostico nei melanomi con spessore di Breslow < 1mm (20,21)[fig. 8]. Tuttavia, nell'ultimo *AJCC staging system*, il suo valore è stato praticamente soppiantato dall'indice mitotico.



[Fig. 8] La progressione neoplastica da nevo a melanoma invasivo nel modello di Clark

## 2.2.5 Ulcerazione

La presenza di ulcerazione è stata riconosciuta come variabile prognostica di sicuro impatto e tende a predire una maggiore probabilità di metastatizzazione a livello viscerale ed osseo (18).

La presenza di ulcerazione deve essere valutata al microscopio e viene definita dalla presenza delle seguenti caratteristiche:

- mancanza dell'epidermide a tutto spessore compreso lo strato corneo;
- evidenza di fenomeni reattivi (depositi di fibrina, neutrofili);
- iperplasia reattiva o assottigliamento dell'epidermide adiacente, in assenza di trauma in anamnesi. Recentemente, è stato suggerito che l'estensione dell'ulcerazione (misurata sia come diametro che come percentuale rispetto all'ampiezza del tumore) possa aggiungere informazioni prognosticamente rilevanti rispetto alla sola presenza dell'ulcerazione (22). La presenza di ulcerazione microscopica dovrebbe essere sempre annotata nel referto istopatologico.

## 2.3 Stadiazione patologica e classificazione molecolare

### 2.3.1 Stadiazione patologica

Il melanoma viene stadiato impiegando la classificazione TNM come descritta dall'ultima revisione dell'*American Joint Committee on Cancer* (18). I pazienti che hanno un melanoma in situ sono compresi nello stadio 0 e quelli che hanno un melanoma invasivo vengono genericamente divisi in sottogruppi differenti:

- Stadio IA (tumore primitivo “a basso rischio”), < 1.0 mm di spessore con ulcerazione o per numero di mitosi  $\geq 1$ ; o >1.0 mm con o senza ulteriori caratteristiche associate e linfonodi clinicamente/istologicamente non coinvolti;
- Stadio IB-II (tumore primitivo a rischio intermedio-alto), < 1.0 mm di spessore con ulcerazione o per numero di mitosi  $\geq 1$ ; o >1.0 mm con o senza ulteriori caratteristiche associate e linfonodi clinicamente/istologicamente non coinvolti;
- Stadio III, con linfonodo sentinella positivo o linfonodi clinicamente positivi e/o secondarismi in transit;
- Stadio IV, secondarismi a distanza.[fig.9]

Table 2: TMN Classification of Melanoma

| Primary tumor (T) |  | Regional lymph nodes (N) |   |     |   |
|-------------------|--|--------------------------|---|-----|---|
| Tx                | Primary tumor cannot be assessed (eg, shave biopsy or regressed melanoma)        | Nx                       | Regional lymph nodes cannot be assessed   | N2  | Metastasis in two to three regional nodes or intra-lymphatic regional metastasis without nodal metastases   |
| T0                | No evidence of primary tumor   | N0                       | No regional lymph node metastasis   | N2a | Clinically occult (microscopic) metastasis  |
| Tis               | Melanoma in situ   | N1                       | Metastasis in one lymph node  | N2b | Clinically apparent (macroscopic) metastasis  |
| T1                | Melanoma $\leq 1.0$ mm in thickness, with or without ulceration                  | N1a                      | Clinically occult (microscopic) metastasis  | N2c | Satellite or in-transit metastasis without nodal metastasis   |
| T1a               | Melanoma $\leq 1.0$ mm in thickness and Clark's level II or III, no ulceration   | N1b                      | Clinically apparent (macroscopic) metastasis  | N3  | Metastasis in four or more regional nodes, or matted metastatic nodes, or in-transit metastasis or satellite(s) with metastasis in regional node(s) |
| T1b               | Melanoma $\leq 1.0$ mm in thickness and Clark's level IV or V or with ulceration | Distant metastasis (M)   |   |     |   |
| T2                | Melanoma 1.01–2.0 mm in thickness, with or without ulceration                    | Mx                       | Distant metastasis cannot be assessed   |     |   |
| T2a               | Melanoma 1.01–2.0 mm in thickness, no ulceration                                 | M0                       | No distant metastasis   |     |   |
| T2b               | Melanoma 1.01–2.0 mm in thickness, with ulceration                               | M1                       | Distant metastasis  |     |   |
| T3                | Melanoma 2.01–4.0 mm in thickness, with or without ulceration                    | M1a                      | Metastasis to skin, subcutaneous tissues, or distant lymph nodes  |     |   |
| T3a               | Melanoma 2.01–4.0 mm in thickness, no ulceration                                 | M1b                      | Metastasis to lungs   |     |   |
| T3b               | Melanoma 2.01–4.0 mm in thickness, with ulceration                               | M1c                      | Metastasis to all other visceral sites or distant metastasis at any site associated with an elevated serum lactic dehydrogenase (LDH) level |     |   |
| T4                | Melanoma > 4.0 mm in thickness, with or without ulceration                       |                          |   |     |   |
| T4a               | Melanoma > 4.0 mm in thickness, no ulceration                                    |                          |   |     |   |
| T4b               | Melanoma > 4.0 mm in thickness, with ulceration                                  |                          |   |     |   |

[Fig. 9] Metodo di stadiazione dell'*American Joint Committee on Cancer*

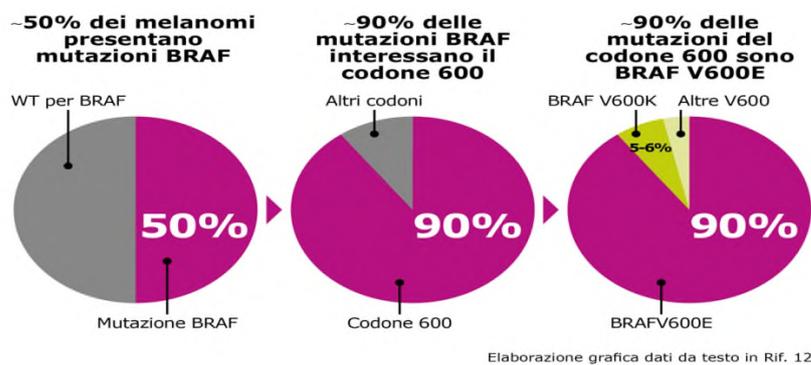
### 2.3.2 Alterazioni molecolari nel melanoma

Nel corso degli ultimi dieci anni sono state identificate numerose alterazioni molecolari associate al melanoma ed in particolare specifiche mutazioni in geni che codificano per chinasi coinvolte nella via di trasmissione del segnale RAS/RAF/MEK/ERK MitogenActivatedProteinKinases (MAPK), responsabile della regolazione dei processi di proliferazione e differenziazione cellulare.

Attualmente si ritiene che questa via di segnale svolga un ruolo cruciale nella patogenesi del melanoma e la conoscenza di tali alterazioni geniche ha portato alla definizione di una nuova 'classificazione molecolare' del melanoma.

L'obiettivo è quello di identificare sottogruppi di pazienti che potenzialmente possano beneficiare di comuni strategie terapeutiche. Circa il 50% dei melanomi presenta mutazioni a carico del gene BRAF, che codifica per una serina-treonina chinasi e ad oggi sono state identificate circa 40 diverse mutazioni. La mutazione attivante più frequente (p.V600E) è a carico dell'esone 15 e rappresenta circa il 90% (88-92%) delle mutazioni BRAF descritte nel melanoma. Essa comporta la sostituzione di una valina con un glutammato a livello del codone 600. La sostituzione di un residuo amminoacidico idrofobico con un amminoacido idrofilico comporta l'attivazione dell'attività serin-treoninchinasica della molecola, mantenuta silente o ipofunzionante all'interno di una sorta di guscio idrofobico nella forma wild-type. Le mutazioni V600K e V600G/R sono meno comuni e sono state dimostrate nel 16% e 3% dei melanomi, rispettivamente (60). I melanomi associati alla mutazione V600E si manifestano in età più giovanile (5%) e fornisce il risultato in tempi molto rapidi (circa 8 ore). Inoltre, la valutazione dell'intensità e percentuale di espressione immunohistochemica della proteina BRAFV600E o l'immunoscore combinato non correlano con la risposta clinica al trattamento con inibitori di BRAF (23). Poiché le mutazioni di BRAF ed NRAS sono in genere mutualmente esclusive, in caso di assenza di mutazioni a carico del gene BRAF, è indicata la valutazione dello stato mutazionale del gene NRAS (24). La valutazione dello stato mutazionale di c-KIT è sicuramente indicata per melanomi acrali e mucosali (25,26). Tuttavia, considerando la bassa frequenza delle mutazioni in c-KIT, anche nel caso di melanomi acrali e mucosali è indicata una prima valutazione delle mutazioni dei geni BRAF e NRAS (28). In presenza di melanomi BRAF e NRAS wild-type, si

procede alla valutazione delle mutazioni del gene c-KIT per la possibilità, in presenza di mutazione, di trattare i pazienti (off label) con inibitori di c-KIT (27, 29), o permetterne l'arruolamento in trial clinici dedicati. Le mutazioni determinano un'aumentata espressione della proteina c-KIT, pertanto è possibile sottoporre i campioni tissutali a valutazione immunohistochimica con anticorpi anti c-KIT nell'ottica di effettuare uno screening dei campioni da sottoporre successivamente ad indagine molecolare(30).[Fig. 10]



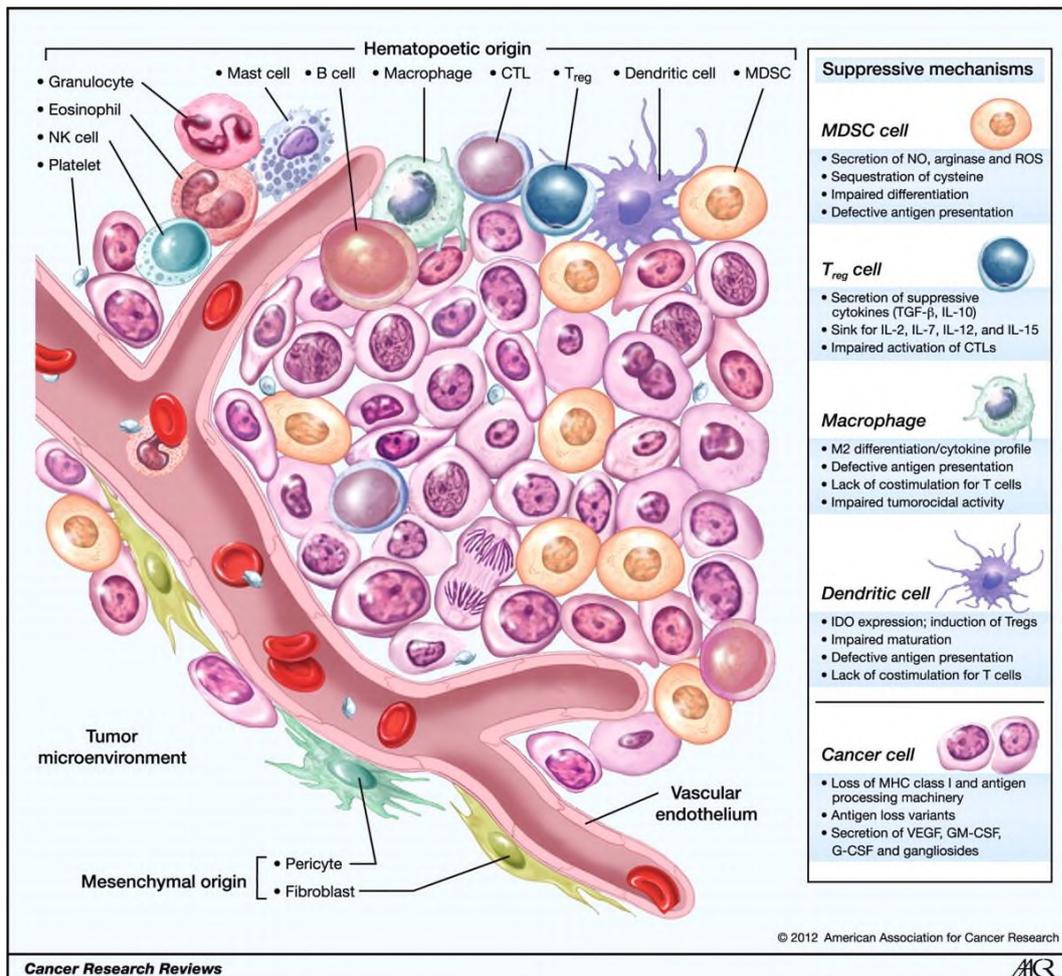
[fig. 10] Incidenza delle mutazioni del gene BRAF

## 2.4 Il microambiente tumorale nel melanoma: ruolo delle cellule del sistema immunitario ed immunoterapie

### 2.4.1 Microambiente e “Immunoscore” nel melanoma

La proliferazione cellulare anomala e la perdita dell'omeostasi giocano un ruolo cruciale nello sviluppo e progressione del melanoma. Questi eventi coinvolgono diversi meccanismi molecolari associati a modifiche del microambiente circostante ed interazioni con la matrice extracellulare locale.

Il microambiente tumorale è una componente essenziale per il processo neoplastico, in quanto favorisce la proliferazione delle cellule tumorali, la sopravvivenza e la migrazione. [Fig. 11]



[Fig. 11] Principali componenti del microambiente tumorale

L'infiltrato linfocitario, macrofagi, mastociti, neutrofili e cellule dendritiche, principali protagonisti del processo infiammatorio, sono spesso presenti nel tumore. Queste cellule infiammatorie sono in grado di rilasciare fattori di crescita, citochine, e chemochine che promuovono la proliferazione, impedendo l'apoptosi ed inducendo alterazioni molecolari che incrementano l'aggressività delle cellule tumorali.

Negli ultimi anni è cresciuto notevolmente l'interesse sull'immuno-regolazione nel cancro. Le cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale svolgono infatti un ruolo fondamentale nella regolazione della progressione tumorale. Per questa ragione, accanto ai classici parametri (grandezza del tumore, morfologia atipica, invasione e tutti i numerosissimi marcatori molecolari associati alla trasformazione e progressione neoplastica) sta diventando essenziale la valutazione di biomarcatori immunologici per stabilire la prognosi, ma soprattutto per indirizzare verso il trattamento terapeutico più adeguato.

Per questa ragione la definizione del profilo immunoistochimico delle cellule immuni del microambiente, definito "Immunoscore" (31) ha assunto un valore prognostico e più recentemente terapeutico sempre più importante nella stratificazione dei pazienti con melanoma.

Tra i marcatori immunoistochimici più utilizzati per definire un corretto *Immunoscore* ci sono CD3, CD4, CD8, CD16, FOXP3, GZMB, TIA-I, CD68 e IL-2RA. Stabilire quali sono i marcatori più adatti da utilizzare dipende sicuramente dal tipo di neoplasia da valutare. Numerose evidenze sperimentali, relative all'*immunoscore* nel melanoma (32) e nel tumore colon-rettale, suggeriscono che i marcatori più utilizzati e meglio associati all'*outcome* clinico sono rappresentati da CD3, CD8, FOXP3 e GRZB, HLA, PD-L1.

#### **2.4.2 CD8**

La glicoproteina transmembrana CD8 ha massa molecolare 68 kDa. È espressa come un eterodimero legato a bisolfuro, costituito da una catena  $\alpha$  32-34 kDa e da una catena  $\beta$  30-32 kDa, oppure come un omodimero costituito da due catene  $\alpha$ . Sia nella variante CD8 $\alpha$  sia nella variante CD8 $\beta$  è presente un dominio simile ad una regione variabile dell'immunoglobulina in una porzione extracellulare dell'N-terminale. Questa caratteristica determina l'appartenenza di queste glicoproteine alla superfamiglia delle

immunoglobuline. CD8 è espressa soprattutto come eterodimero  $\alpha\beta$  dalla maggior parte dei timociti, nonché dai linfociti T soppressori/citotossici maturi, ristretti del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I. Una percentuale di linfociti T  $\gamma\delta$  e di cellule NK esprimono l'omodimero  $\alpha\alpha$  CD8.

### 2.4.3 GRZ-B

I granzimi sono serin-protesi neutre, immagazzinate in speciali granuli litici dei linfociti T citotossici (CTL) e nelle cellule Natural Killer (NK). Questi CTL e NK sono fortemente coinvolti nell'eliminazione delle cellule neoplastiche e di quelle infettate da virus. I granuli secretori contenenti perforine e granzimi sono fondamentali per l'attività citolitica. Si ritiene che il granzima B penetri nella cellula target attraverso un canale a forma di poro prodotto da una perforina, al fine di indurre frammentazione del DNA e apoptosi. Il granzima B è stato descritto anche in CTL e cellule NK neoplastiche.

Nel melanoma, i macrofagi associati al tumore svolgono diversi ruoli per promuovere la crescita del tumore, come indurre la trasformazione dei melanociti sotto irradiazione ultravioletta, aumentando l'angiogenesi nei melanomi e sopprimendo l'immunità antitumorale. Poiché le cellule Tr1 che esprimevano granzyme B e perforina potevano specificamente eliminare le cellule di origine mieloide che presentavano antigene, abbiamo esaminato se le cellule Tr1 nel melanoma potessero eliminare i macrofagi che promuovano il tumore e come l'interazione tra le cellule Tr1 e i macrofagi potrebbe influenzare la crescita delle cellule melanoma.(33)

### 2.4.4 FOXP3

**FOXP3** (abbreviazione di **forkhead box P3**) è un fattore di trascrizione della famiglia **forkhead** espresso dai **linfociti T regolatori**. Ha una funzione fisiologica importante nel controllo della risposta immunitaria, garantendo la tolleranza immunologica ed evitando il fenomeno dell'autoimmunità. Mutazioni del gene FOXP3 sono state identificate in alcuni casi di malattie autoimmunitarie generalizzate, come le **poliendocrinopatie**, in cui il sistema immunitario causa la distruzione delle ghiandole endocrine.

Un'alta espressione di FOXP3 nel melanoma primario è associata con progressione tumorale (34).

I linfociti Treg FOXP3+ nel melanoma primario sono associati con la mutazione BRAF ma non è stata trovata nessuna associazione con la risposta agli inibitori BRAF (49)

#### **2.4.5 HLA**

E' un complesso di molti geni localizzato sul cromosoma 6 nell'uomo. HLA comprende più di 200 geni codificanti. Il locus contiene i geni che codificano per le proteine HLA «classiche» di I e II classe e le proteine di III classe:

- geni HLA di classe I (A, B, C)
- geni HLA di classe II (DP, DQ, DR)
- geni HLA di classe III (C2, C4, TNF proteine del complemento)
- Geni HLA di classe I codificano per proteine che sono espresse da tutte le cellule nucleate. E' facilmente inducibile dall'IFN- $\gamma$  che è prodotto in caso di infezione virale. In questo modo è favorita la presentazione dell'antigene e la conseguente morte della cellula infetta.
- Geni HLA di classe II codificano per proteine che sono espresse da cellule specializzate: monociti e macrofagi, cellule dendritiche, linfociti B e alcuni tipi di cellule T.
- I globuli rossi non esprimono nessuna molecola HLA poiché cellule senza nucleo.

L'esame dell'interazione tra l'antigene umano (HLA) e il risultato prognostico ha mostrato risultati interessanti e una correlazione tra la riduzione o l'up-regulation di questi antigeni e la prognosi è stata osservata attraverso diversi tipi di cancro. Nel melanoma maligno, la classe Ia di HLA è stata considerata come influencer sugli effetti del trattamento farmacologico e la prognosi complessiva, e la classe HLA classe Ib e le cellule T regolatori sono state correlate con la progressione tumorale. Anche se non esiste ancora un trattamento immunologico standardizzato in tutto il mondo,

l'interazione tra il sistema antigene (HLA) umano e la progressione tumorale sembra essere un promettente fuoco nel modo di ottimizzare il trattamento del melanoma maligno. (35)

#### **2.4.6 PD-1/ PD-L1 e “tumorescape”**

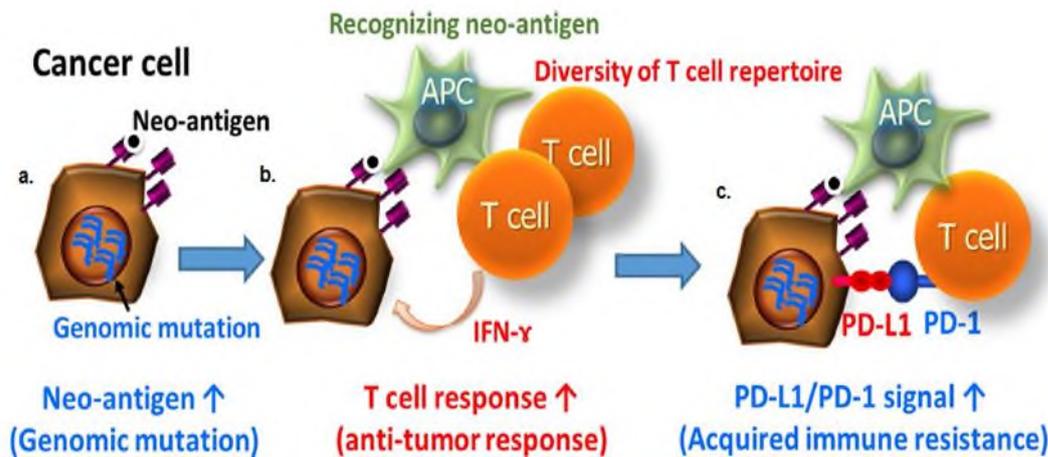
Il recettore PD-1 (Programmed-Death-1, morte programmata-1) è un recettore immunoinibitore espresso dai linfociti attivati, ma è presente anche sulla superficie dei linfociti B, macrofagi, cellule dendritiche e linfociti infiltranti il tumore (TIL)(36,37); nell'uomo è codificata dal gene PDCD1. Dal punto di vista strutturale PD-1 è una glicoproteina costituita da 288 aa ed è caratterizzata da un dominio tipo Ig variabile (V-Type) all'estremità N-terminale, un dominio trans-membrana ed un dominio citoplasmatico che contiene un motivo *immunoreceptortyrosine-basedinhibitor (ITIM)* ed un motivo *immunoreceptortyrosine-basedswitch (ITSM)*.

Il suo ruolo principale è quello di limitare l'autoimmunità e di inibire l'attività delle cellule T in periferia e nei tessuti durante la risposta infiammatoria all'infezione (38, 39).

Il recettore PD-1 si lega a due ligandi, PD-L1 e PD-L2, e con essi gioca un ruolo importante nella down-regulation del sistema immunitario, impedendo l'attivazione delle cellule T, riducendo a sua volta l'autoimmunità e promuovendo la self-tolerance. mentre l'espressione di PD-L2 è limitata alle cellule presentanti l'antigene (APC), quella di PD-L1 ha una distribuzione tissutale molto più ampia e la sua interazione con PD-1 è essenziale per i meccanismi di tolleranza periferica. (40)

La proteina PD-L1 (programmed death-ligand1), anche conosciuta come CD274 (cluster of differentiation 274) o B7-H1 (B7 homolog 1), è una proteina trans membrana di 40kDa codificata dal gene CD274. Tale proteina è espressa su un grande varietà di cellule incluse le natural killer, i macrofagi, cellule dendritiche, cellule epiteliali e cellule dell'endotelio vascolare. (41)Tra i più promettenti inibitori del recettore PD1 vi è un anticorpo monoclonale, Nivolumab (anti PD-1). I risultati dello studio di fase 1 'dose-ranging' presentato nel corso dell'annuale Congresso ASCO dimostrano la sua sicurezza e la sua attività anti-tumorale, in terapia combinata con Ipilimumab (anticorpo

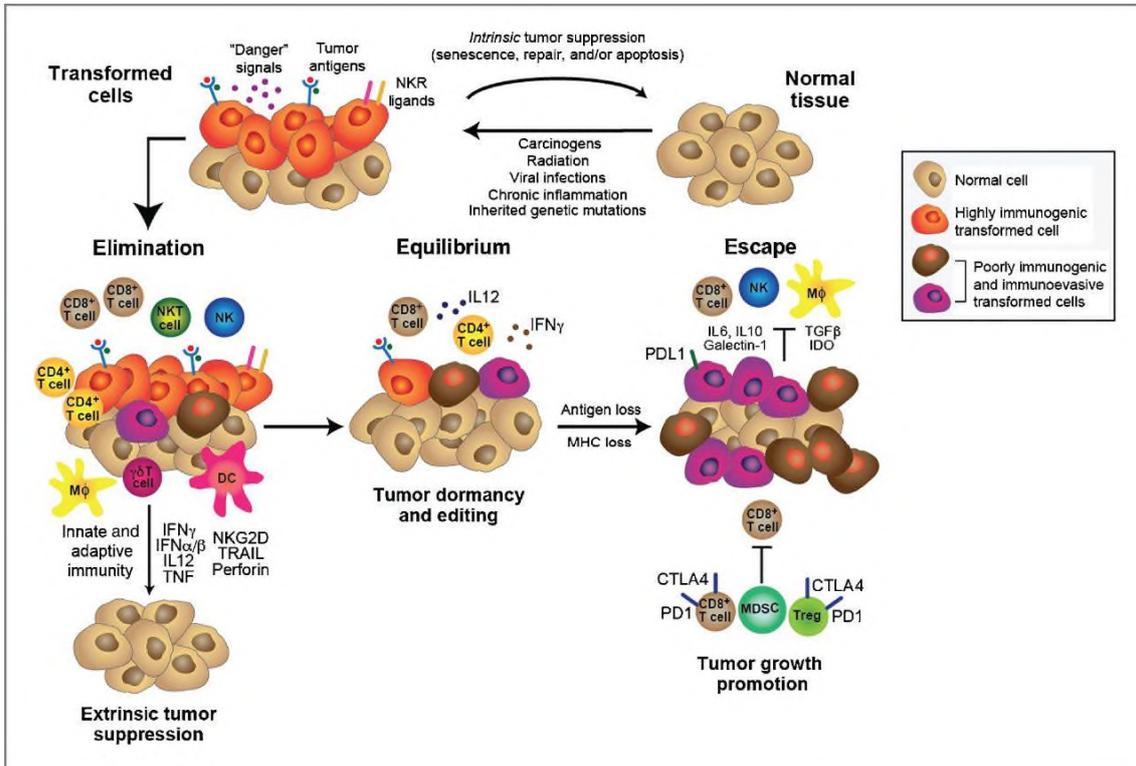
monoclonale anti-CTLA-4) sia in somministrazione contemporanea (associazione) che in sequenza, in pazienti con melanoma avanzato. I pazienti hanno raggiunto un tasso di sopravvivenza a un anno pari all'82%. I dati su Nivolumab in combinazione con Ipilimumab sono stati pubblicati sul *New England Journal of Medicine (NEJM)* e i dati sulla stima di sopravvivenza sono stati presentati al 49esimo Congresso Annuale dell'*American Society of Clinical Oncology*. [Fig. 12]



[Fig 12]Espressione di neo-antigeni sulla superficie delle cellule tumorali (a.) Le APC riconoscono gli antigeni tumorali ed inducono l'attivazione della risposta immunitaria mediata dai linfociti T citotossici (b.) Inibitori come PD-L1/PD-1, espressi sulla superficie delle cellule tumorali e dei linfociti T rispettivamente, causano l'inibizione della risposta immunitaria e quindi immuno-resistenza (c.).

Il “*tumorescape*” rappresenta un meccanismo di evasione dal sistema immunitario dell'ospite messo in atto dalle cellule tumorali per crescere e proliferare maggiormente. L'efficienza della risposta immunitaria contro il tumore dipende dalla coordinazione di CTLs. In condizioni fisiologiche c'è uno stato di equilibrio in cui le cellule immunitarie mantengono un'adeguata intensità e portata al fine di limitare l'insorgenza di una risposta autoimmune contro i tessuti sani. In condizioni patologiche, come in presenza di neoplasia, il sistema immunitario dell'ospite si scatena contro le cellule malate perché riconosciute come “estrane”. Tuttavia, in alcune condizioni, le cellule tumorali possono esprimere sulla loro superficie una serie di molecole in grado di inibire la risposta (checkpoint immunitario), tramite diversi meccanismi quali l'induzione all'anergia o l'apoptosi, l'attivazione delle cellule T, promuovendo così la progressione e la metastatizzazione. (42,43)

Molte sono le molecole coinvolte nella regolazione del checkpoint immunitario ma due in particolare sono bersagli farmacologici in numerosi trial clinici: CTLA-4 e PD-L1, che regolano negativamente l'attività dei linfociti T rispettivamente in fase precoce ed in fase tardiva della crescita tumorale, spegnendo quindi la risposta immune contro le cellule malate. [Fig. 13]



[fig. 13] Rappresentazione schematica delle tre fasi del “cancerimmunoediting”: eliminazione, equilibrio ed “escape”.

## 2.5 Immunoterapie

Nel corso degli anni si è sempre più palesata l'ipotesi che la trasformazione cellulare in senso neoplastico è determinata da una serie di mutazioni che attivano gli oncogeni e inattivano i meccanismi soppressivi della crescita cellulare; il sistema immunitario riveste un ruolo fondamentale nella lunga serie di eventi che porta allo sviluppo di un tumore.

Si deve tener presente che il sistema immunitario controlla ed elimina le cellule che vanno incontro a trasformazione neoplastica, sorvegliando l'organismo e difendendolo dalle degenerazioni di tipo maligno. L'immunoterapia rappresenta il nuovo traguardo

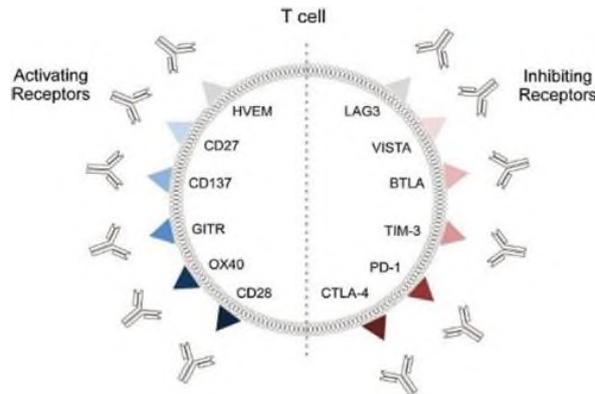
nel trattamento delle neoplasie, che si aggiunge alla chirurgia, alla radioterapia e alla chemioterapia.

Il sistema immunitario di un soggetto per combattere patologie come il cancro può agire in due modi:

- Stimolare il sistema immunitario ad agire maggiormente o in maniera più intelligente per attaccare le cellule tumorali
- Fornire componenti al sistema immunitario, come le proteine artificiali

Alcuni tipi di immunoterapia sono chiamate anche terapia biologica o bioterapia. Negli ultimi decenni l'immunoterapia è diventata una parte importante del trattamento di alcuni tipi di cancro[fig. 14]. Nuovi tipi di trattamenti sono ora in fase di studio e modificheranno il modo in cui viene trattato il cancro in futuro. L'immunoterapia funziona meglio per alcuni tipi di cancro rispetto ad altri. È utilizzata da sola per alcuni tumori, ma per altri sembra funzionare meglio quando in combinazione ad altri tipi di trattamento. I principali tipi di immunoterapia ora utilizzati per trattare il cancro includono:

- Gli anticorpi monoclonali: questi sono versioni artificiali di proteine del sistema immunitario. Gli anticorpi possono essere molto utili nel trattamento del cancro perché possono essere progettati per attaccare una parte molto specifica di una cellula tumorale.
- Inibitori del checkpoint immunitario: questi farmaci aiutano a riconoscere e attaccare le cellule tumorali.
- Vaccini contro il cancro
- Immunoterapie non specifiche: stimolano il sistema immunitario in modo generico (IL-2, INF, citochine).



[Fig. 14] Target dell'immunoterapia.

Gli anticorpimonoclonali agiscono in modi diversi. (Fig. 3) Alcuni aumentano la risposta immunitaria contro le cellule tumorali legandosi a loro e agendo come marker per il sistema immunitario per distruggerle.[fig. 15] Un esempio è Alemtuzumab (Campath), che viene utilizzato per il trattamento di alcuni pazienti con leucemia linfocitica cronica (LLC). Alemtuzumab si lega al CD52, che si trova sui linfociti (che includono le cellule leucemiche). Una volta legato, l'anticorpo attrae le cellule immunitarie per distruggerle. Alcuni anticorpi monoclonali aumentano la risposta immunitaria mirata. Altri attaccano e bloccano gli antigeni sulle cellule tumorali (o altre cellule vicine). Ad esempio, il trastuzumab (Herceptin) è un anticorpo contro la proteina HER2.

Gli anticorpi monoclonali possono essere uniti a un farmaco chemioterapico o ad una particella radioattiva, in tal caso si parla di anticorpi monoclonali coniugati (MAK, MAB). Il mAb rilascia il farmaco laddove è più necessario. Questo riduce il danno alle cellule sane. Tra gli anticorpi radiomarcati: Ibritumomabtiuxetano(Zevalin) è un anticorpo contro l'antigene CD20, che si trova su linfociti B. L'anticorpo fornisce la radioattività direttamente alle cellule B cancerose e può essere usato per trattare alcuni tipi di linfoma non-Hodgkin. Il trattamento con questo tipo di anticorpo è noto anche come radioimmunoterapia (RIT).

Gli anticorpi monoclonali sono somministrati per via endovenosa. I possibili effetti indesiderati possono includere: febbre, brividi, debolezza, mal di testa, nausea, vomito, diarrea, ipotensione, eruzioni cutanee.

Una parte importante del sistema immunitario è la capacità di distinguere tra le cellule normali e non. In questo modo attacca le cellule che non riconosce, per far ciò utilizza dei checkpoint, molecole su alcune cellule immunitarie che hanno bisogno di essere attivate (o inattivate) per avviare la risposta immunitaria. Le cellule tumorali a volte trovano il modo di utilizzare questi checkpoint per evadere la risposta immunitaria.

I trattamenti che colpiscono sia PD-1 che PD-L1 possono aumentare la risposta immunitaria contro le cellule tumorali e hanno dimostrato una grande efficacia nel trattamento di alcuni tipi di cancro, soprattutto nel melanoma. [fig. 15]

Esempi di farmaci che hanno come target PD-1 includono:

- Pembrolizumab (Keytruda®)
- Nivolumab (Opdivo®)

Questi hanno dimostrato di essere utili nel trattamento del melanoma e nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), con risposte durature. Molti altri trattamenti anti PD-1 e PD-L1 sono ora in fase di sperimentazione.

| Checkpoint Inhibitor | Killer Isotype     | Nonkiller Isotype  |
|----------------------|--------------------|--|
| Anti-CTLA-4          | Ipilimumab (IgG1)  | Tremelimumab (IgG2)  |
| Anti-PD-1            | Pidilizumab (IgG1) | Nivolumab (IgG4), pembrolizumab (IgG4)                                       |
| Anti-PD-L1           | -                  | BMS-936559 (IgG4), MPDL-3280A<br>(mutated IgG1 that eliminates ADCC and CDC) |

ADCC = antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; CDC = complement dependent cytotoxicity; CTLA = cytotoxic T-lymphocyte antigen; Ig = immunoglobulin; PD = programmed cell death protein.

[Fig. 15] Attivazione di ADCC/CDC da parte degli inibitori del checkpoint immunitario[50]

L'immunoterapia è una parte molto attiva della ricerca sul cancro. Gli obiettivi principali sono rappresentati dal potenziamento dell'immunità tumore-specifica, dall'aumentato reclutamento di cellule effettrici nel sito tumorale e dal tentativo di bloccare o limitare i meccanismi di immuno-evasione tumorale (44).

#### 4. SCOPO DELLA TESI

Il melanoma rappresenta tra le più temibili patologie oncologiche per la sua elevata propensione a sviluppare metastasi, ed essendo, da sola, responsabile del 60% delle morti per cancro della cute. È più comune nella popolazione caucasica, in particolare nel continente oceanico ed è in forte incremento negli ultimi anni. Nel tempo sono stati dettagliatamente descritti, oltre a fattori di rischio specifici, come le radiazioni UV, anche numerose alterazioni molecolari, in particolare specifiche mutazioni in geni che codificano per MAP chinasi (MAPK) coinvolte nella regolazione dei processi di proliferazione e differenziazione cellulare. Inoltre, negli ultimi anni, è stato ampiamente dimostrato che un ruolo fondamentale nella patogenesi e progressione, può essere anche attribuito ai meccanismi molecolari associati a modifiche del microambiente tumorale ed interazioni specifiche delle cellule neoplastiche con la matrice extracellulare locale. L'infiltrato linfocitario (TIL), i macrofagi, i mastociti, i neutrofili e le cellule dendritiche, principali protagonisti del processo infiammatorio, sono infatti spesso presenti nel tumore. Nel melanoma in particolare i TIL hanno un importante valore prognostico che ha reso essenziale la valutazione di biomarcatori immunologici (Immunoscore) per stabilire la prognosi, ma soprattutto per indirizzare verso il trattamento terapeutico più adeguato.

Nell'ambito dei melanomi meritano una menzione particolare i cosiddetti melanomi sottili, ovvero quelli di spessore  $\leq 1$  mm che, sebbene caratterizzati da un'altissima percentuale di guarigione dopo semplice escissione chirurgica (sopravvivenza libera da malattia a 5 anni del 95-98% circa), sono tuttavia in grado di metastatizzare, in una percentuale di casi del 10% circa, anche a notevole distanza di tempo dalla diagnosi; per questa ragione si è alla ricerca di biomarcatori in grado di predire la tendenza alla metastatizzazione a distanza, per ottimizzare la stratificazione terapeutica dei pazienti.

Alla luce di queste osservazioni l'obiettivo del presente lavoro di tesi è quello di indagare se la caratterizzazione immunofenotipica delle cellule immunitarie presenti nel microambiente tumorale possa svolgere un ruolo nella definizione di nuovi fattori prognostici di pazienti affetti da melanoma sottile. L'analisi di espressione è stata realizzata mediante immunohistochimica con l'utilizzo dei marcatori: **CD8, FOXP3, GRZ-B, PD-L1, HLA.**

## **5. MATERIALI E METODI**

### **5.1 Casistica pazienti e lesioni analizzate**

È stato eseguito uno studio retrospettivo su 31 pazienti, sottoposti ad asportazione di melanomi di spessore inferiore o uguale ad 1mm dal 2009 al 2017 presso l'A.O.U. San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona. Per ciascuno dei pazienti sono stati raccolti i più importanti parametri clinico-patologici relativi al carcinoma, quali età, sesso, TNM, Deep Invasion secondo Breslow, sede del tumore, presenza di ulcerazione o regressione, numero di mitosi /mm<sup>2</sup> delle cellule neoplastiche ed infine la presenza di infiltrato linfocitario. Tutti i dati sono stati inseriti in un database ed utilizzati come casistica per lo studio sull'espressione dei marcatori dell'infiltrato linfocitario e la correlazione tra parametri clinici, anatomico-patologici e outcome clinico. Tutti i campioni provenivano da pazienti caucasici. La presenza di cellule tumorali nei tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE) è stata monitorata mediante la colorazione istochimica ematossilina ed eosina (H&E). Tutti i campioni sono stati revisionati da patologi esperti (AA dell'Istituto Nazionale Tumori G. Pascale, Napoli) in accordo alla classificazione American Joint Committee on Cancer (AJCC), usando sezioni di tessuto standard ed appropriate analisi immunohistochimiche (IHC). Ciascuna lesione era analizzata dopo acquisizione di consenso informato da parte dei pazienti inclusi nella casistica.

### **5.2 Procedura immunohistochimica per CD8, FOXP3, GRZ-B, PD-L1, HLA.**

#### **5.2.1 Deparaffinatura, reidratazione e smascheramento**

Le sezioni di tessuto tumorale FFPE sono stati tagliate ad uno spessore di 3-4 micron di su vetrini adesivi (# KP-SIL-3056, scivoli adesivi KP-Silan, Klinipath BV, Typograaf, Duiven, Paesi Bassi) e conservati in stufa a 65 ° C (caldo secco) per almeno 1 h e meno di 1 settimana prima dell'uso, successivamente sono state deparaffinate in un solvente organico, un mezzo chiarificante (Bioclear) allo scopo di rimuovere l'agente includente, in 2 passaggi di 10 minuti ognuno e reidratate con una serie graduata di etanolo (100%, 90% e 70% circa 5 minuti a passaggio) ed infine in acqua distillata.

I vetrini preparati sono stati incubati per 12 min a 110 ° C in un soluzione CC1 (Medical Systems Ventana (Cat #: 950-124), Tucson, AZ, USA), e posti all'interno di una pentola

a pressione commerciale (BiocareMedical, Decloaking Camera DC12 , Pike Lane, Concord, CA, USA).

Per un'ottimale riuscita del test, è importante lo smascheramento dei siti antigenici. Quest'ultimo può essere effettuato con agenti enzimatici (tampone citrato, EDTA) o tramite l'utilizzo di elevate temperature. In quest'ultimo caso si utilizza una pentola a pressione, che, pur determinando un fine deterioramento dei dettagli citologici, risulta molto maneggevole e consente la riduzione dei tempi di lavoro. I vetrini vengono immersi in una vaschetta, contenente una soluzione deparaffinante, contenuta nella pentola e, raggiunta l'ebollizione, si attende per 20 minuti. Si consiglia di non chiudere ermeticamente il coperchio durante questo passaggio. I vetrini vengono poi trasferiti in una vaschetta contenente la soluzione smascherante, il coperchio si chiude ermeticamente e si attende il raggiungimento della massima pressione, segnalato dal fischio della pentola. Si attende per 3 minuti e si fa fuoriuscire tutto il vapore tramite l'apposita valvola. Si apre il coperchio e si lascia raffreddare i vetrini a temperatura ambiente per circa 20 minuti.

### **5.2.2 Blocco della perossidasi endogena**

Tutte le procedure sono state effettuate a temperatura ambiente (circa 25 ° C) dopo una incubazione di 5 minuti con volume pari a 150 µL per ciascuna sezione con il blocco delle perossidasi endogene (ER/PR PeroxidaseBlockreagent - Dako; SK310; o perossido di idrogeno al 3%) per 5 minuti a temperatura ambiente.

### **5.2.3 Blocco proteico**

Per ridurre la formazione di legami aspecifici tra gli anticorpi e le proteine endogene, si applicano 150µL di blocco proteico su ciascuna sezione (1% goatserum (bcam Cambridge science Park Milton Road, Cambridge, UK), 4% BSA in PBS) per 5 minuti. Seguono due lavaggi di 5 minuti in tampone PBS.

### **5.2.4 Incubazione con anticorpo primario**

Questa fase deve essere preceduta da un'opportuna diluizione dell'anticorpo primario con soluzione diluente per anticorpi per raggiungere un ottimale rapporto diluizione/tempo di incubazione. Gli anticorpi utilizzati sono i seguenti:

|       | Clone          | Ph | Conc/diluizione                          | Specie | Tipo        | Incubazione |
|-------|----------------|----|--|--------|-------------|-------------|
| CD8   | C8/144B        | 8  | 1:100                                    | Mouse  | Monoclonale | 1h          |
| FOXP3 | D2W8E          | 8  | 1:250                                    | Rabbit | Monoclonale | 1h          |
| GRZ-B | Ab4059         | 6  | 1:200                                    | Rabbit | Policlonale | 1h          |
| PD-L1 | 28-8           | 6  | Pre-diluito                              | Rabbit | Monoclonale | 1h          |
|       | E1L3N          | 6  | Pre-diluito                              | Rabbit | Monoclonale | 1h          |
| HLA   | HCA2 +<br>HC10 | 8  | Rapporto 1:1<br>ciascuno diluito<br>1:10 | Mouse  | Monoclonali | 1h          |

### 5.2.5 Reazione di visualizzazione

Il legame dell'anticorpo primario con l'antigene, viene visualizzato mediante incubazione con un secondo anticorpo (anti rabbit o anti mouse) associati, a sua volta, mediante un polimero di destrano, a molecole di perossidasi di rafano (HRP).

Gli anticorpi secondari utilizzati sono precostituiti e presentano le seguenti caratteristiche:

- Anti-Mouse ER/PR PharmDxTm (Lotto 101200845) Ref. SK310, DAKO;
- Anti-Rabbit Hercep Test visualizationreagent (Lotto 20040939) Ref. SK001, DAKO.

Su ogni sezione sono stati dispensati 150µl di anticorpo e lasciati incubare per 40 minuti a temperatura ambiente, seguito da lavaggio in tampone PBS (2 lavaggi di 5 minuti ciascuno).

### 5.2.6 Sviluppo cromogenico

Le sezioni vengono poi incubate con circa 150µL di substrato cromogeno (DAB, 3,3'-Diaminobenzidina e acqua ossigenata al 2,5-3%) e lasciate incubare per 5 minuti al buio. In seguito vengono lavate con una soluzione di wash (Dako, SK310) per circa 5 minuti per eliminare l'eccesso di DAB. La reazione con la perossidasi produce un precipitato visibile di colore marrone in corrispondenza del sito antigenico.

### 5.2.7 Controcolorazione

Le sezioni tissutali vengono immerse in Ematossilina 0,02% per circa 1 minuto, in modo da controcolorare i nuclei; viene, quindi, eliminato l'eccesso con acqua distillata e si lascia differenziare in acqua corrente per almeno 5 minuti.

### 5.2.8 Disidratazione, Chiarificazione, Montaggio e Lettura al microscopio

Le sezioni vengono disidratate seguendo una scala crescente di etanolo (Etanolo 70%, 90% e 100%, 3 minuti per ogni gradazione), chiarificate mediante passaggio in Xilene al 100% (4 passaggi di 3 minuti circa e successivamente coperti con un vetrino coprioggetto (DAKO # CS100, Glostrup, Danimarca).

Infine, i vetrini così preparati sono letti al microscopio ottico in campo chiaro standard.

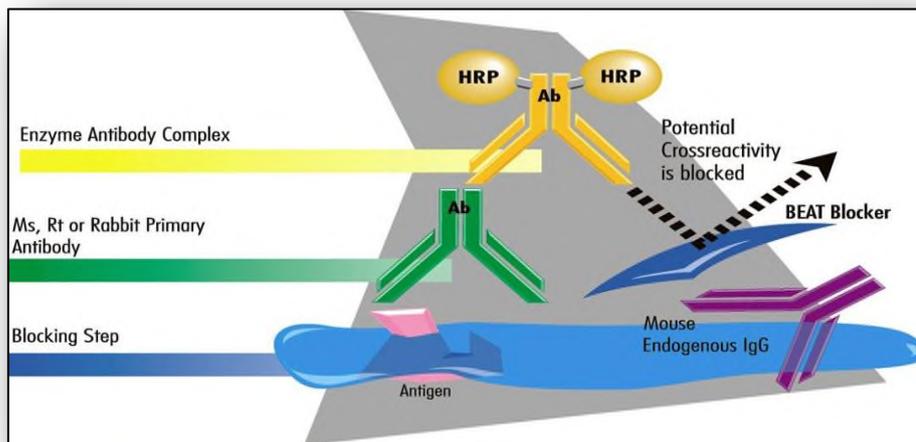


Fig. N: IHC: se la concentrazione dell'anticorpo è troppo elevata rispetto all'antigene disponibile, si avrà un ridotto legame con l'anticorpo e un risultato negativo non sarà dovuto alla mancanza di antigene, ma ad un eccesso di anticorpo e viceversa.

### 5.3 Doppia immunoistochimica

È stata effettuata una doppia immunoistochimica tra FOXP3 e CD8 su campioni di tessuto FFPE. Dopo aver de-paraffinato e idratato con una scala decrescente di alcol (100%, 90%, 70% e 55%) i tessuti sono stati incubati con una soluzione per smascheramento antigenico in una pentola a pressione (Biocare) per 10 minuti a 110 °C. Dopo il raffreddamento dei vetrini, sono stati eseguiti tre passaggi di blocco per ridurre il rischio di segnali aspecifici. In particolare è stato utilizzato un blocco per le

perossidasi e per le fosfatasi endogene e successivamente un blocco proteico per limitare i legami aspecifici degli anticorpi. Le sezioni sono state incubate per 90 min a temperatura ambiente con un cocktail di mAbsFOXP3 e CD8 specifici. Gli anticorpi anti- FOXP3 e CD8 sono stati rilevati utilizzando il Kit MACH 2 (Biocare). Dopo 5 minuti di incubazione con il cromogeno DAB, le sezioni di tessuto sono state incubate per 15 min con il cromogeno Fast Red (Biocare). Dopo lavaggio con acqua distillata, i nuclei sono stati contrastati con ematossilina a temperatura ambiente per 30 secondi.

#### **5.4 Valutazione IHC**

Intensità di staining e la percentuale di cellule tumorali colorate in ciascuna lesione per l'espressione di HLA sono state quantificate secondo un sistema di gradazione variabile in intensità pari a 0 (negative), 1 (moderatamente colorate), 2 (intensamente colorate) ed in variazione di intervalli del 10%. I punteggi così ottenuti per intensità e percentuale sono stati utilizzati per ottenere uno score finale attraverso la seguente formula:  $HLA \text{ total score} = \text{score intensity} \times \% \text{ di cellule colorate}$ , con intervallo variabile tra 0 e 100. La valutazione dello staining di PDL1 è stata ottenuta attraverso la conta in % delle cellule tumorali colorate con intervallo variabile tra 0 e 100%. La valutazione del numero di cellule positive per CD8, FOXP3 e GRZB è avvenuta attraverso la conta cellulare di cellule positive presenti in 3 campi 20X in microscopia in chiaro.

#### **5.5 ANALISI STATISTICA**

In questo lavoro, tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il pacchetto software SPSS (Statistical Package for Social Science Inc., Chicago, Illinois, USA), versione 20.

Tutte le variabili relative alle principali caratteristiche clinico-patologiche del melanoma sono state incluse nell'analisi statistica.

La descrizione dell'espressione dei marcatori caratterizzanti iTILs con le principali caratteristiche clinico-patologiche è stata analizzata mediante tavole di contingenza.

La correlazione tra HLA, PD-L1 ed il numero di CD8, FOXP3 e GRZB è stata analizzata utilizzando lo Spearman rank correlation test. La correlazione tra PD-L1 e HLA è stata analizzata utilizzando il Fisher exact test. La differenza di espressione di

CD8, FOXP3, GRZB, PD-L1, HLA, FOXP3 e CD8 in base ai gruppi di età, sesso, sede ulcerazione, regressione, numero di mitosi e infiltrato linfocitario è stata analizzata utilizzando il test di Mann-Whitney o il test di Kruskal-Wallis. Infine le differenze nelle distribuzioni delle espressioni dei marcatori in relazione alla DFS sono state calcolate mediante il metodo di Kaplan-Meier e analizzate con il log-rank test. Valori di P inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente significativi.

## 6. RISULTATI

### 6.1 CARATTERISTICHE CLINICHE DEI PAZIENTI SELEZIONATI

La casistica analizzata era composta da 31 pazienti, di cui il 48% di sesso maschile ed il 52% di sesso femminile. L'età media dei pazienti era di 56 anni, con un intervallo variabile da 30 a 78 anni.

I melanomi asportati erano localizzati nel 15% dei casi al capo, nel 40% agli arti e nel restante 45% dei casi al tronco.

Il 35% dei melanomi analizzati erano dei tumori in situ, mentre il 65% era rappresentato da melanomi di spessore fino a 1mm, con uno spessore Breslow medio complessivo di 0,4mm.

Il 90% dei casi presentava regressione così come nel 90% dei casi era presente ulcerazione, tali parametri erano negativi nel restante 10% dei tumori. Il numero medio di mitosi era di 1,2/mm<sup>2</sup> (con intervallo variabile da 0 a 4 mitosi/mm<sup>2</sup>).

Infiltrato linfocitario, definito come linfociti infiltranti il tumore (TILs), era presente nel 60% delle lesioni analizzate ed assente nel rimanente 40%.

La mediana di sopravvivenza libera da malattia (Disease Free Survival, DFS) è risultata di 72 mesi, con un intervallo da 20 a 105 mesi (Fig. 16); soltanto 3 soggetti sui 31 totali hanno presentato recidive locali e/o a distanza.

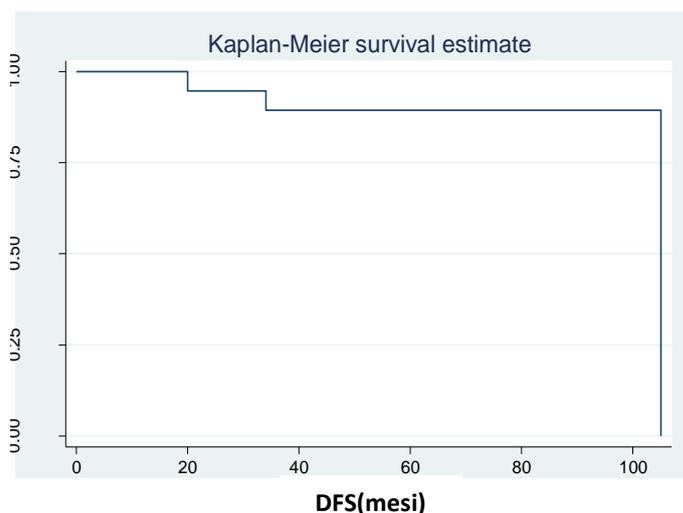


Fig. 15

## 6.2 ESPRESSIONE IMMUNOISTOCHEMICA DEI MARCATORI DELL'INFILTRATO INFIAMMATORIO

L'analisi immunohistochemica ha evidenziato una localizzazione di membrana per **CD8**, **PD-L1** ed **HLA**. **FOXP3** ha mostrato una localizzazione nucleare ed infine **GRZ-B** è risultato espresso nel citoplasma. Tutti i marcatori sono stati valutati all'interno dell'infiltrato linfocitario.

L'analisi delle cellule CD8+ ha mostrato un valore medio nei campioni analizzati di 48,25 cellule, con un intervallo da 15 a 89 (Fig. 17A), le cellule GRZB+ erano in media 4,12 con un range variabile da 0 a 10 (Fig.17B).

L'espressione di PD-L1 è risultata negativa nel 63% dei casi analizzati, con un'espressione massima che nella nostra casistica è risultata del 25%, riscontrata nel 3,7% dei campioni (Fig.17C).



Fig. 17A



Fig.17B

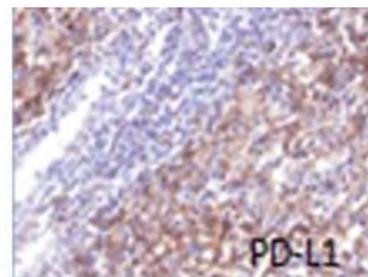


Fig.17C



Fig. 17D



Fig.17E

L'espressione di HLA è risultata negativa nel 21% dei melanomi analizzati, mentre era variabilmente espresso nel restante 79% dei casi (Fig.17D); le cellule FOXP3+ erano in media 21 nella nostra casistica, con un intervallo da 0 a 87 (Fig.17E).

### 6.3 DESCRIZIONE DELLA CARATTERIZZAZIONE DELL'INFILTRATO LINFOCITARIO IN RELAZIONE ALLE CARATTERISTICHE CLINICHE

Le caratteristiche clinico-patologiche sono state correlate tra loro e con i parametri immunofenotipici GRZB, HLA, PD-L1, FOXP3, CD8.

Esiste nella nostra casistica una correlazione statisticamente significativa tra la presenza di TIL ed il sito di insorgenza del melanoma, ovvero il numero di linfociti infiltranti il tumore era superiore nei melanomi insorti su capo/collo e tronco rispetto a quelli localizzati a livello degli arti ( $p=0,0016$ ).

Il sito di insorgenza influenza in modo statisticamente significativo il livello di espressione di HLA (Fig. 18) e di cellule CD8+, con una maggiore espressione nei melanomi insorti su arti e tronco rispetto al capo/collo ( $p=0,0036$  e  $p=0,04$  rispettivamente).

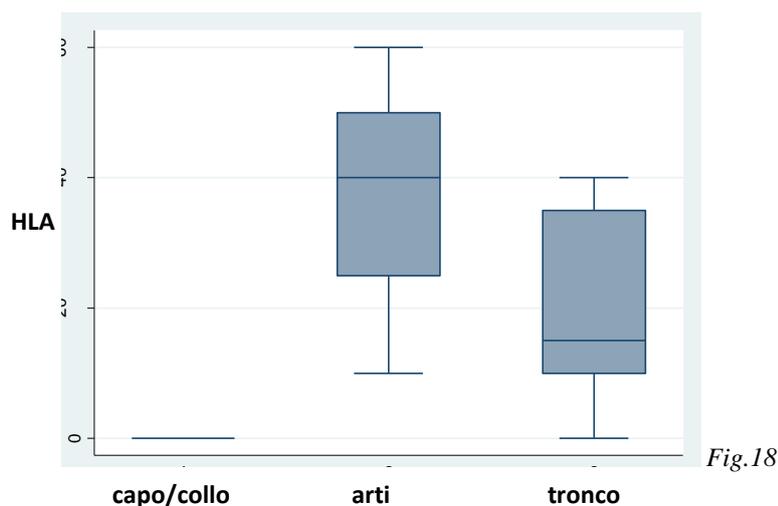


Fig.18

Lo spessore secondo Breslow appare correlato in maniera staticamente significativa nella nostra casistica all'espressione di PD-L1, con un aumento dell'espressione di questo marcatore all'aumentare dello spessore ( $p=0,05$ ) ed all'ulcerazione, maggiormente riscontrata nei melanomi di spessore maggiore ( $p=0,02$ , Fig. 19).

Lo spessore appare inoltre correlato positivamente al numero di mitosi ( $rS=0,5$ ;  $p=0,02$ ) ed alla presenza di cellule FOXP3+ ( $rS=0,4$ ;  $p=0,04$ ).

I pazienti con melanomi di maggiore spessore hanno una ridotta DFS ( $p=0,03$ ); lo spessore appare, altresì, inversamente correlato alla presenza di cellule CD8+ (correlazione negativa,  $rS= -0,3$ ;  $p=0,05$ ).

Fig.19

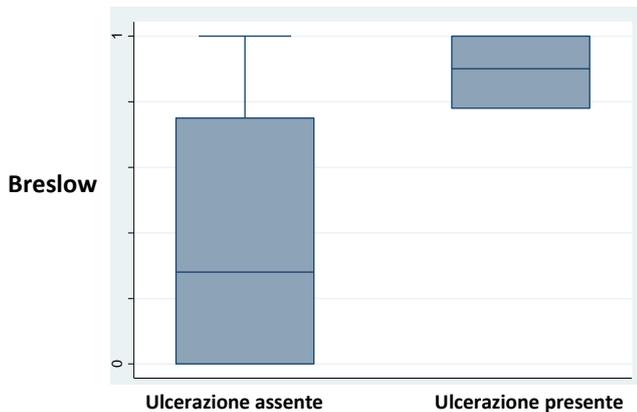
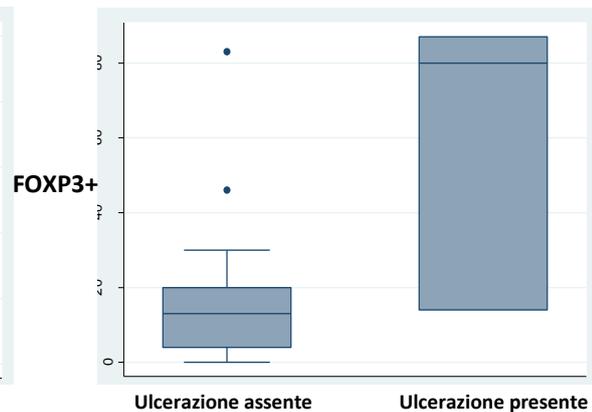


Fig.20



La presenza di ulcerazione appare correlata ad un maggior numero di cellule FOXP3+ ( $p=0,05$ , Fig.20), nonché ad una ridotta DFS ( $p=0,04$ ).

La presenza di TILs è correlata alla maggiore espressione di PD-L1 ( $p=0,04$ ) e di HLA ( $p=0,05$ ), e ad un maggior numero di cellule FOXP3+ ( $p=0,05$ ).

La regressione tumorale appare correlata con una maggiore espressione di HLA nella casistica analizzata ( $p=0,04$ ).

Il maggiore numero di mitosi, l'età avanzata, nonché l'aumento del valore del rapporto tra cellule FOXP3+/CD8+ sono inversamente correlati alla DFS ( $p=0,02$ ;  $p=0,03$ ;  $p=0,06$  rispettivamente).

## 7. Discussione

Il microambiente tumorale è una componente essenziale del processo di evoluzione tumorale, in quanto favorisce la proliferazione delle cellule tumorali, la sopravvivenza e la migrazione. L'infiltrato linfocitario, macrofagi, mastociti, neutrofili e cellule dendritiche, principali protagonisti del processo infiammatorio, sono in grado di rilasciare fattori di crescita, citochine, e chemochine che promuovono la proliferazione, impedendo l'apoptosi ed inducendo alterazioni molecolari che incrementano l'aggressività delle cellule tumorali.

Questo processo appare essere particolarmente attivo nella patogenesi e progressione del melanoma, che viene infatti considerato tra i tumori maggiormente "immuno-modulati".

Per questa ragione, nella definizione prognostica del melanoma, accanto ai classici parametri (grandezza del tumore, morfologia atipica, invasione e tutti i numerosi marcatori molecolari associati alla trasformazione e progressione neoplastica), sta diventando essenziale la valutazione di biomarcatori immunologici mediante l'identificazione del profilo immunoistochimico delle cellule immuni del microambiente. Questo approccio, definito "*Immunoscore*" ha assunto un valore prognostico e più recentemente terapeutico sempre più importante nella stratificazione dei pazienti con melanoma. Tra i marcatori immunoistochimici più utilizzati per definire un corretto *immunoscore* ci sono CD3, CD4, CD8, CD16, FOXP3, GZMB, TIA-I, CD68 e IL-2RA, mentre l'espressione di PD-L1 da parte delle cellule tumorali è attualmente utilizzata, in altri tipi di tumore, come un potenziale biomarcatore per prevedere risposte cliniche ad immunoterapie basate sull'utilizzo di inibitori anti-PD-1 e PD-L1. L'espressione immunoistochimica di PD-L1 sulle cellule tumorali e/o sulle cellule immunitarie è stata associata ad una migliore risposta in pazienti trattati con anticorpi diretti contro il blocco PD1/PD-L1 in NSCLC (45), RCC, carcinoma ovarico e altri.(46). La perdita di HLA si è dimostrata associata a meccanismi di elusione della risposta immunitaria da parte delle cellule neoplastiche in vitro e ad un andamento clinico sfavorevole in numerose patologie neoplastiche, tra cui il melanoma (47).

Nell'ambito del melanoma un campo di particolare interesse è rappresentato dai melanomi sottili, ovvero di spessore  $\leq 1$  mm, caratterizzati da una elevatissima

percentuale di guarigione dopo semplice trattamento chirurgico locale, in alcuni casi accompagnato da escissione del linfonodo sentinella (sopravvivenza libera da malattia di circa 95-98% a 5 anni) (48). Attualmente viene diagnosticato un numero sempre più cospicuo di melanomi cutanei “sottili” ( $\leq 1$  mm), con un’incidenza maggiore in pazienti giovani e di sesso femminile. Sebbene la maggior parte delle lesioni “sottili” sia associata ad una prognosi eccellente, una parte di queste può sviluppare recidive e/o metastasi a distanza con esito fatale. Già da tempo è emerso che sebbene lo spessore secondo Breslow sia il singolo più importante fattore prognostico nel melanoma in generale, per le lesioni “sottili” è indispensabile l’identificazione di ulteriori parametri morfologici, biologici e/o molecolari che possano predire la progressione neoplastica.

L’impiego di nuove tecniche per la diagnosi precoce quali la microscopia in epiluminescenza, la larga diffusione di programmi di screening dei pazienti a rischio e le campagne di educazione alla prevenzione hanno contribuito al riconoscimento di un numero sempre più cospicuo di neoplasie in fase iniziale e quindi di spessore assai inferiore rispetto a quello delle lesioni che venivano diagnosticate in passato (49). Questo ha portato al raggiungimento di un *plateau* ed in alcuni paesi ad una lieve diminuzione del tasso di mortalità per melanoma. Sono stati pubblicati in letteratura numerosi studi volti ad identificare fattori prognostici nel melanoma “sottile”, peraltro con risultati spesso contraddittori, verosimilmente anche in relazione alla eterogeneità delle casistiche studiate. Nel corso degli ultimi 30 anni sono stati prospettati come indicativi di prognosi sfavorevole numerosi parametri clinico-patologici, tra i quali: il sesso maschile, l’età avanzata, le sedi tronco e testa/collo, il III e IV livello di Clark, le grandi dimensioni della lesione, la presenza di marcati fenomeni di regressione, l’assenza di infiltrato infiammatorio, la presenza di aree di ulcerazione ed un elevato indice mitotico (50). In particolare, molti studi hanno sottolineato la possibile influenza negativa sulla prognosi dei fenomeni di regressione del tumore, i quali porterebbero a sottostimare lo spessore originario della neoplasia. Purtroppo, il relativamente esiguo numero di casi di melanoma “sottile” metastatizzato, il fatto che in uno stesso paziente spesso i melanomi “sottili” siano neoplasie multiple e la scarsa omogeneità delle casistiche studiate, hanno rappresentato e continuano a rappresentare i principali ostacoli al raggiungimento di risultati conclusivi su questo tema (51).

Per questa ragione si è alla ricerca di nuovi biomarcatori in grado di predire l'esito clinico della patologia, allo scopo di ottimizzare la stratificazione prognostica e terapeutica dei pazienti.

In questo studio abbiamo caratterizzato l'immunofenotipo della componente infiammatoria del microambiente tumorale in una casistica di 31 melanomi sottili diagnosticati presso la A.O.U. "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", per verificare se e quali componenti cellulari possano essere associati all'andamento clinico della patologia ed alle caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti, tra cui fattori prognostici sfavorevoli già noti nella storia clinica del melanoma. L'analisi di espressione è stata realizzata mediante immunohistochimica con l'utilizzo di anticorpi monoclonali e policlonali diretti contro i marcatori CD8, FOXP3, GRZB, HLA e PDL1.

L'analisi della nostra casistica ha dimostrato che, analogamente a quanto accade nei melanomi avanzati, nei melanomi sottili vi è un'espressione variabile di HLA e PDL1. A differenza dei melanomi avanzati, i melanomi sottili presentano, tuttavia, una maggiore espressione di HLA ed una minore espressione di PDL1; tale risultato induce ad ipotizzare che nei melanomi sottili i meccanismi di immunoescape non siano ancora del tutto espressi. A conferma di tale ipotesi vi è il riscontro di una stretta correlazione tra numero di TILs ed espressione di HLA e/o presenza di regressione tumorale, caratteristiche note per essere correlate ad una migliore prognosi. Lo sviluppo di meccanismi di immunoescape appare essere correlato con l'aumento dimensionale delle lesioni, un maggiore spessore appare infatti essere correlato con un'aumentata espressione di PDL1, con la presenza di ulcerazione ed il numero di mitosi, nonché con una variazione del tipo di infiltrato linfocitario peritumorale, costituito da un maggior numero di cellule FOXP3 positive ed un minor numero di linfociti CD8 citotossici. Gli eventi stocastici che sottendono tali variazioni sono probabilmente da ascrivere all'attivazione di differenti *pathway* di progressione neoplastica, coinvolti nei meccanismi di proliferazione cellulare, angiogenesi e tolleranza immunologica.

La validità del nostro studio e della casistica analizzata sono supportate dal riscontro di significatività statistiche in termini di DFS con caratteristiche cliniche prognostiche note quali età, spessore, ulcerazione e numero di mitosi.

È interessante notare come l'aumentare del rapporto FOXP3+/CD8+ sia correlato in modo statisticamente significativo con un maggiore spessore secondo Breslow e con una minore DFS. Queste osservazioni ci hanno indotto a validare tale dato mediante una doppia colorazione immunoistochimica FOXP3-CD8, che ha mostrato una maggiore quantità di cellule FOXP3+ in relazione a quelle CD8+ nei tessuti di pazienti che hanno mostrato nel tempo recidive di melanoma; al contrario, i restanti pazienti mostravano un basso numero di linfociti FOXP3+ in relazione alle cellule esprimenti CD8. Dalla doppia colorazione immunoistochimica è emerso che, quando presenti, le cellule esprimenti FOXP3 sono in stretto contatto con le cellule CD8+, suggerendo che la potenziale interazione tra i due fenotipi cellulari possa essere un importante meccanismo di controllo della crescita tumorale. Resta da definire se tale meccanismo sia indotto dalle cellule tumorali o dalla attivazione stessa delle cellule CD8 citotossiche.

In letteratura è riportato che la presenza di cellule Treg FOXP3+ è in grado di influenzare negativamente la risposta alle immunoterapie in pazienti con melanoma metastatico (52), mentre la combinazione FOXP3+/CD8+ è stata descritta soltanto come un utile biomarker per predire la risposta al trattamento con chemioterapia neoadiuvante in alcuni sottotipi di tumore mammario, come i tumori HER2+ e Triple Negative Breast Cancer (TNBC) (53). È inoltre noto che i melanomi con mutazione BRAF mostrano un'elevata densità di cellule FOXP3+ Tregs, suggerendo un ruolo attivo della mutazione del gene BRAF nella modulazione del sistema immunitario (54).

In conclusione i nostri dati hanno evidenziato non soltanto che l'infiltrato linfocitario, nelle sue componenti più rappresentative, può influenzare la storia naturale dei melanomi sottili, ma che la combinazione di più biomarcatori può rappresentare un importante strumento prognostico/predittivo per la stratificazione dei pazienti affetti da questa patologia. I nostri dati hanno mostrato come i meccanismi di immunoescape siano un evento precoce nello sviluppo di una progressione neoplastica del melanoma. Sarebbe quindi auspicabile, caratterizzando una casistica di pazienti più ampia, definire un algoritmo specifico, combinando i diversi biomarcatori immunitari, che possa essere utilizzato nella pratica clinica per identificare gli individui affetti da malattie dotate di maggiore aggressività biologica e pertanto con maggiore probabilità di mostrare nel

tempo recidive di patologia, allo scopo di ottenere migliori stratificazioni prognostiche e di delineare, per tali pazienti, strategie terapeutiche ottimali utilizzando farmaci in grado di bersagliare i meccanismi di elusione della risposta immunitaria.

## 8. REFERENZE

1. Istituto Toscano Tumori, Novembre 2012: Crocetti E., Borgognoni L. Il melanoma cutaneo: dalle raccomandazioni cliniche agli indicatori diagnostico terapeutici (<http://rtrt.ispo.toscana.it/rtrt/rapporti/melanoma.pdf>)
2. Gruppo Melanoma ITT. Raccomandazioni cliniche per il melanoma cutaneo. Istituto Toscano Tumori –ITT. Scientific Press, Firenze. Maggio 2007
3. Chen ST, Geller AC, Tsao H. Update on the Epidemiology of Melanoma. *Curr Dermatol Rep.* 2013;2:24- 34.
4. Airtum. I tumori in Italia, rapporto 2009. I trend dei tumori negli anni 2009. *Epidemiologia & Prevenzione*, 2009
5. Crocetti E, Mangone L, Lo Scocco G et al. Prognostic variables and prognostic groups for malignant melanoma. The information from Cox and Classification And Regression Trees analysis: an Italian population-based study. *Melanoma Res.* 2006;16:429-33.
6. Choudhury K, Volkmer B, Greinert R, Christophers E, et al. Effectiveness of skin cancer screening programmes. *Br J Dermatol.* 2012; Suppl 2:94-8
7. Boniol M, Autier P , Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbeds use: systematic review and metanalysis. *BMJ* 2012 Jul;345:e4757.
8. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet (UV) light and skin cancer. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer* 2007 Mar 1; 120(5):1116-22
9. Tannous ZS, Mihm MC Jr, Sober AJ, Duncan LM. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol.* 2005;52:197-203.
10. Tuong W, Cheng LS, Armstrong AW. Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. *Dermatol Clin.* 2012 ;30:113-24.

11. D'Ath P, Thomson P. Superficial spreading melanoma. *BMJ*. 2012;344:e2319.
12. Betti R, Martino P, Vergani R et al. Nodular melanomas: analysis of the casistic and relationship with thick melanomas and diagnostic delay. *J Dermatol*. 2008;35:643-50.
13. Reed JA, Shea CR. Lentigomaligna: melanoma in situ on chronically sun-damaged skin. *Arch Pathol Lab Med*. 2011;135:838-41.
14. Haneke E. Ungual melanoma - controversies in diagnosis and treatment. *DermatolTher*. 2012;25:510- 24.
15. Pereda C, Traves V, Requena C et al. Clinical presentation of acral lentiginous melanoma: a descriptive study. *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104(3):220-6.
16. Clark WH, Elder DE, Guery D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1893-1904.
17. Guerry D, Synnestved M, Elder DE, et al. Lessons from tumor progression : the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent. *J Invest Dermatol* 1993;100:342S-5S.
18. Balch CM, Gershenwald JE, Soong Sj, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J ClinOncol* 2009;27:6199-6206.
19. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis in the cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-908.
20. Gimotty PA, Elder DE, Douglas L, et al. Identification of High-Risk Patients Among Those Diagnosed With Thin Cutaneous Melanomas. *J ClinOncol* 2007;20:1129-1134.
21. Buttner P, Garbe C, Bertz J, et al. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer* 1995;75:2499-2506.
22. In 't Hout FE1, Haydu LE, Murali R, Bonenkamp JJ, Thompson JF, Scolyer RA. Prognostic importance of the extent of ulceration in patients with clinically localized cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 2012 Jun;255(6):1165-70.

23. Wilmott JS, Menzies AM, Haydu LE, Capper D, Preusser M, Zhang YE, Thompson JF, Kefford RF, von Deimling A, Scolyer RA, Long GV. BRAF(V600E) protein expression and outcome from BRAF inhibitor treatment in BRAF(V600E) metastatic melanoma. *Br J Cancer*. 2013 Mar 5;108(4):924-31.
24. Woodman SE, Lazar AJ, Aldape KD, Davies MA. New strategies in melanoma: molecular testing in advanced disease. *Clin Cancer Res*. 2012 Mar 1;18(5):1195-200.
25. Handolias D, Salemi R, Murray W, Tan A, Liu W, Viros A, Dobrovic A, Kelly J, McArthur GA. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010 Apr;23(2):210-5.
26. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J ClinOncol*. 2006 Sep 10;24(26):4340-6.
27. Lyle M, Long GV. Diagnosis and treatment of KIT-mutant metastatic melanoma. *J ClinOncol*. 2013 Sep 10;31(26):3176-81.
28. Hodi FS, Corless CL, Giobbie-Hurder A, Fletcher JA, Zhu M, Marino-Enriquez A, Friedlander P, Gonzalez R, Weber JS, Gajewski TF, O'Day SJ, Kim KB, Lawrence D, Flaherty KT, Luke JJ, Collichio FA, Ernstoff MS, Heinrich MC, Beadling C, Zukotynski KA, Yap JT, Van den Abbeele AD, Demetri GD, Fisher DE. Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J ClinOncol*. 2013 Sep 10;31(26):3182-90.
29. Carvajal RD, Antonescu CR, Wolchok JD, Chapman PB, Roman RA, Teitcher J, Panageas KS, Busam KJ, Chmielowski B, Lutzky J, Pavlick AC, Fusco A, Cane L, Takebe N, Vemula S, Bouvier N, Bastian BC, Schwartz GK. KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA*. 2011 Jun 8;305(22):2327-34.
30. Dai B, Cai X, Kong YY, Yang F, Shen XX, Wang LW, Kong JC. Analysis of KIT expression and gene mutation in human acral melanoma: with a comparison between primary tumors and corresponding metastases/recurrences. *Hum Pathol*. 2013 Mar 22. pii: S0046-8177(13)00027-0.

31. J. Galon, B. A. Fox, C. B. Bifulco, G. Masucci, T. Rau, G. Botti, F. M. Marincola, G. Ciliberto, F. Pages, P. A. Ascierto, and M. Capone. Immunoscoring and Immunoprofiling in cancer: an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015
32. Ascierto PA, Agarwala S, Botti G, Cesano A, Ciliberto G, Davies MA, Demaria S, Dummer R, Eggermont AM, Ferrone S, Fu YX, Gajewski TF, Garbe C, Huber V, Khleif S, Krauthammer M, Lo RS, Masucci G, Palmieri G, Postow M, Puzanov I, Silk A, Spranger S, Stronck DF, Tarhini A, Taube JM, Testori A, Wang E, Wargo JA, Yee C, Zarour H, Zitvogel L, Fox BA, Mozzillo N, Marincola FM, Thurin M. Future perspectives in melanoma research : Meeting report from the "Melanoma Bridge". Napoli, December 1st-4th 2015.
33. Natural Killer Cell Recognition of Melanoma: New Clues for a More Effective Immunotherapy; Raquel Tarazona,<sup>1,\*</sup> Esther Duran,<sup>2</sup> and Rafael Solana<sup>3</sup>
34. High expression of FOXP3 in primary melanoma is associated with tumour progression. Gerber AL<sup>1</sup>, Müntz A, Schlapbach C, Shafiqhi M, Kiermeier D, Hüsler R, Hunger RE.
35. HLA class Ia and Ib molecules and FOXP3<sup>+</sup> TILs in relation to the prognosis of malignant melanoma patients. Melsted WN, Johansen LL, Lock-Andersen J, Behrendt N, Eriksen JO, Bzorek M, Scheike T, Hviid TVF. *Clin Immunol*. 2017 Oct;183:191-197. Epub 2017 Sep 4. PMID: 28882620
36. Topalian S. et al. Targeting the PD-1/B7-1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*, 2012 April ; 24(2): 207–212.
37. James L. Riley. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev*. 2009 May ; 229(1): 114–125.
38. Sheppard KAFL, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ . *FEBS Lett* 2004; 574: 37-41.

39. Brahmer J. R. et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2455-65.
40. Topalian S. et al., Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer, *N Engl J Med* 2012; 366:2443-2454; June 28, 2012.
41. XiangjiaoMeng, Zhaoqin Huang, FeifeiTeng, Ligang Xing, Jinming Yu. Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treatment Reviews* 41 (2015) 868–876.
42. Kamphorst A. O. et al., Manipulating the PD-1 pathway to improve immunity. *Current Opinion in Immunology*, 2013 Jun;25(3):381-8.
43. Francisco, L. M. et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. J Exp Med.* 206, 3015–3029 (2009).
44. Rozeman EA, Dekker TJA, Haanen JBAG, Blank CU Advanced Melanoma: Current Treatment Options, Biomarkers, and Future Perspectives..*Am J ClinDermatol.* 2017 Nov 21.Review.
45. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review.Brody R, Zhang Y, Ballas M, Siddiqui MK, Gupta P, Barker C, Midha A, Walker J.Lung Cancer. 2017 Oct;112:200-215. Epub 2017 Aug 10. Review.
- 46.Immune-Related Adverse Events Associated with Anti-PD-1/PD-L1 Treatment for Malignancies: A Meta-Analysis.Wang PF, Chen Y, Song SY, Wang TJ, Ji WJ, Li SW, Liu N, Yan CX.FrontPharmacol. 2017 Oct 18;8:730. eCollection 2017.
47. Multiple structural and epigenetic defects in the human leukocyte antigen class I antigen presentation pathway in a recurrent metastatic melanoma following immunotherapy. Chang CC, Pirozzi G, Wen SH, Chung IH, Chiu BL, Errico S, Luongo M, Lombardi ML, Ferrone S. *J Biol Chem.* 2015 Oct 30;290(44):26562-75.
48. Survival among patients with clinical stage I cutaneous malignant melanoma diagnosed in Western Australia in 1975/1976 and 1980/1981. Heenan PJ, English DR, Holman CDJ, Armstrong BK. *Cancer.* 1991. 68:2079-2087.

49. Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe. *Cancer*. 2000. Garbe C, McLeod GRC, Buettner PG 89:1269-1278.
50. Marghoob AA, Koenig K, Bittencourt FV et al. Breslow thickness and Clark level in melanoma. Support of including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer Staging. *Cancer* 2001. 88:589-595.
51. Massi D, Franchi A, Santucci M, Fattori, Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma. *Pathologica*. 2002 94:282-289
52. Yao X1, Ahmadzadeh M, Lu YC, Liewehr DJ, Dudley ME, Liu F, Schrumpp DS, Steinberg SM, Rosenberg SA, Robbins PF. Levels of peripheral CD4(+)FoxP3(+) regulatory T cells are negatively associated with clinical response to adoptive immunotherapy of human cancer. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5688-96.
53. Asano Y1, Kashiwagi S1, Goto W1, Kurata K1, Noda S1, Takashima T1, Onoda N1, Tanaka S2, Ohsawa M2, Hirakawa K1. Tumour-infiltrating CD8 to FOXP3 lymphocyte ratio in predicting treatment responses to neoadjuvant chemotherapy of aggressive breast cancer. *Br J Surg*. 2016 Jun;103(7):845-54.
54. Connall L, Samantha E, Bowyer E, White A, Grieu Iacopetta F, Trevenen M, Iacopetta B, Benhur A, Millward FOXP3+ T regulatory lymphocytes in primary melanoma are associated with BRAF mutation but not with response to BRAF inhibitor. *M, Pathology*. 2015 Oct;47(6):557-63.